



## F7DIBKDS Metody práce s buněčnou kulturou a dynamické systémy

### Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

#### TKÁŇOVÉ KULTURY – ZÁKLADNÍ METODY

Autor: Ing. Jana Štěpanovská, Ing. Roman Matějka

#### TEORETICKÝ ÚVOD

Tkáňové kultury dnes představují jeden ze základních prostředků biomedicínského výzkumu, díky kterému bylo možné částečně omezit pokusy na zvířatech a který umožnil vědcům zaměřit se na zkoumání konkrétní tkáně či určitého typu buněk. Na druhou stranu má tento model také své limity. Buňky jsou často kultivované na planárních plastových površích v kultivačním médiu, jehož složení není ani zdaleka tak komplexní jako vnitřní prostředí organismu. Buňky se tím pádem časem mění a jejich chování již nemusí odpovídat tomu, jak by reagovaly za fyziologických podmínek.

Historie tkáňových kultur sahá až do roku 1885, kdy se německému zoologovi Wilhelmu Rouxovi podařilo odebrat tkáň z kuřecího embrya a udržet tyto buňky naživu po dobu několika dní v teplém solném roztoku. Na tento objev následně navázal americký embryolog Ross Granville Harrison, který popsal metodu, jak za laboratorních podmínek kultivovat nervové buňky izolované ze žabiho zárodku a pozorovat jejich růst. Harrisonovo pozorování bylo však limitované častou bakteriální kontaminací jeho kultur. Přišel proto s nápadem pracovat za aseptických podmínek. Všechno laboratorní sklo si opaloval, chirurgické náčiní si vyvařoval a roušky a filtrační papíry autoklávoval. Tímto postupem dosáhl toho, že byl schopen udržet vyizolované buňky v kultuře i pět týdnů. V roce 1910 navštívil Harrisona v jeho laboratoři Montrose Burrows, který později adaptoval jeho kultivační metodu a společně s Alexísem Carrelem z Rockefellerova Institutu v New Yorku začali kultivovat buňky nejrůznějších tkání a zvířat a začali též experimentovat se složením kultivačního média. Postupně byly identifikovány nejdůležitější komponenty kultivačního média jako aminokyseliny, soli, vitamíny a glukóza, tedy látky nezbytné pro buněčný metabolismus. V roce 1911 byl pak zaveden pojem „tkáňová kultura“, který označuje buňky či tkáň, která je schopna růst mimo tělo, takzvaně *in vitro*, což v překladu z latiny znamená „ve skle“.

Prvním krokem k založení tkáňové kultury je izolace daného buněčného typu z rostliny, zvířete či lidského organismu. Tato izolace je většinou založena na kombinaci mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení mezibuněčné hmoty, ke které mohou být použity enzymy jako kolagenáza, elastáza nebo trypsin. Následná separace buněk spočívá v centrifugaci založené na rozdílných fyzikálních vlastnostech (velikost částic, hustota) či využití různých kultivačních podmínek. Tímto způsobem je možné získat tzv. **primokulturu**. Tento termín označuje buňky čerstvě odebrané z organismu a kultivované do té doby, než porostou celý povrch kultivační nádoby – vytvoří tzv. **konfluentní** vrstvu. Krátce před dosažením konfluence se buňky od povrchu kultivační nádoby uvolní (mechanicky, pomocí enzymů jako je např. trypsin či kolagenáza nebo pomocí chelátorů dvojmocných iontů jako např. EDTA). Vzniklá buněčná suspenze se zředí na požadovanou koncentraci a nasadí se do nových kultivačních



Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

nádob. Celý postup se označuje jako „pasáž“ a nově nasazené kultuře se říká subkultura.

Pasážováním je možné získat tzv. **buněčné linie**, které mohou být odvozené z normálních či rakovinných tkání. Buněčné linie odvozené z normálních, netransformovaných tkání mají omezenou životnost, protože se jim postupně zkracují telomery (koncové části chromozómů) až pod kritickou délku, která již neumožňuje další replikaci chromozomu. Buňky se tedy dělí pouze po omezenou dobu a počet dělení je dán tzv. Hayflickovým limitem. U lidských somatických buněk je maximální počet dělení kolem 50, poté vstoupí buňka do období senescence (stárnutí), které může vyústit v apoptózu (buněčnou smrt). Počet dělení do jisté míry závisí na stáří organismu, ze kterého byly buňky izolovány. Čím je jedinec v okamžiku odebrání tkáně starší, tím jsou jeho buňky schopny menšího počtu pasáží.

Oproti tomu se nádorové buňky či buňky imortalizované dělí neomezeně, nepodléhají Hayflickovu limitu a mohou tedy poskytnout kontinuální buněčnou linii. První taková lidská kontinuální buněčná linie byla založena v roce 1951, kdy v nemocnici Johna Hopkinse v USA odebral lékař část karcinomu děložního čípku 27leté černošce jménem **Henrietta Lacks** a odeslal ho do laboratoře. Zde zjistili, že buňky izolované z biopsie jsou životaschopné a dobře se množí, aniž by podléhaly senescenci. Henrietta nakonec rakovině podlehla, ale její buňky se staly jedním z nejdůležitějších nástrojů moderní medicíny, biologie i genetiky. Posloužily jako nástroj pro testování nových léků či vakcín. Umožnily výzkum lidských virů i ověření účinků radiace a stavu beztlíže na lidské buňky. HeLa buňky jsou dodnes kultivovány v mnoha laboratořích po celém světě, figurují ve zhruba 75 tisících vědeckých studiích a jejich celková hmotnost několikasetnásobně převýšila hmotnost dospělé Henrietty.



Obr. 1: Henrietta Lacks, po které je pojmenována HeLa buněčná linie

## MORFOLOGIE

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku, CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

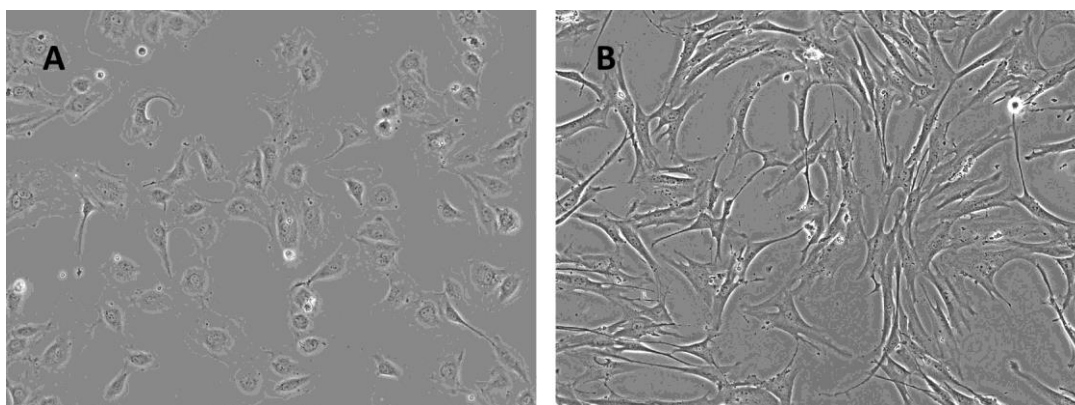


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

Buněčné kultury lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin na kultury suspenzní a adherentní. Kultury suspenzní jsou typické pro hematopoetické buňky a všechny buňky, které z nich vznikají, nebo pro některé nádorové buňky. Dalším typem jsou kultury adherentní (přisedlé). Ty vyžadují kontakt s mezibuněčnou hmotou, kterou v podmínkách *in vitro* často nahrazuje dno kultivační nádoby. Pokud tyto buňky nemohou adherovat, dochází k jejich apoptóze (programované buněčné smrti), která je v tomto případě nazývána *anoikis* z řeckého výrazu pro bezdomovectví.

Na základě tvaru adherentních buněk ve 2D kultuře, tzv. morfologie, můžeme odhadnout, o jaký buněčný typ by se mohlo jednat. Fibroblasty, stejně jako mezenchymální kmenové buňky mají protáhlý, vřetenovitý tvar. Naproti tomu epiteliální buňky nebo buňky endotelové mají polygonální tvar a ve zředěné kultuře tvoří ostrůvky k sobě těsně přilehlých buněk.



Obr 2: A – endotelové buňky, B - mezenchymální kmenové buňky

## KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Savčí buňky se nejčastěji kultivují při 37 °C v inkubátoru, který udržuje normální atmosféru s 5% příměsí CO<sub>2</sub>. Oxid uhličitý se rozpouští v kultivačním médiu a vytváří uhličitý pufr, který pomáhá udržovat optimální hodnotu pH kultivačního média v rozmezí 7-7,4. Pro vizuální kontrolu pH se do média přidává jako indikátor fenolová červen. V alkalickém prostředí má médium fialovou barvu, při optimálním pH 7,4 je médium sytě červené. Čím je vyčerpanější a kyselější, tím se mění jeho barva do oranžova při pH 7,0 a při pH 6,5 až do žluta. K takovýmto změnám by však nemělo docházet a médium by se správně mělo buňkám měnit každé dva dny. Tkáňové kultury jsou také závislé na vzdušném kyslíku, takže je třeba zajistit, aby mohl kyslík k buňkám dobře difundovat, což ovlivňuje i vrstva média nad buňkami.

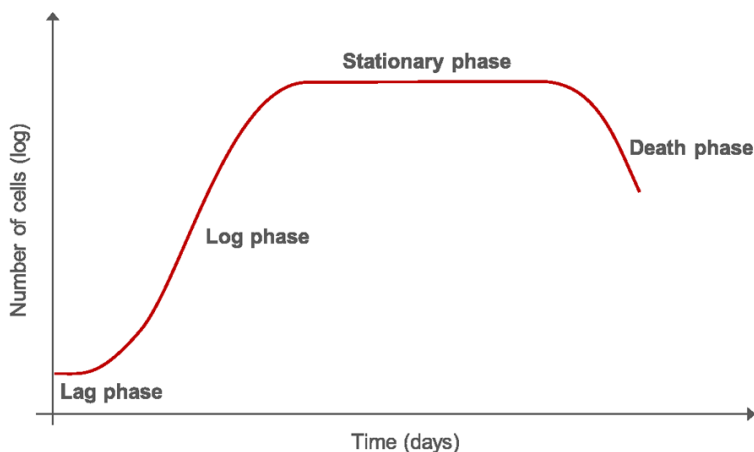
Potřebné živiny buňky čerpají z kultivačního média. Jedná se o izotonický roztok s osmolaritou 280 – 320 mOsm/l, obsahující anorganické ionty (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), glukózu jako zdroj energie, aminokyseliny a vitamíny. Nezbytnou příměsí nejběžněji používaných médií jako je alfa-MEM (alfa modifikované Eaglovo médium) nebo DMEM

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

(Dulbecco's Modified Eagle Medium) je sérum, které slouží mimo jiné jako zdroj růstových faktorů, hormonů, lipidů, stopových prvků a proteinů, které umožňují buněčnou adhezi. Všeobecně je snaha sérum, jakožto nedefinovanou složku média, nahradit, protože se stává, že buňky rostou lépe v přítomnosti séra určitého výrobce nebo se dokonce liší odezva buněk na jednotlivé šarže séra. Nejčastěji se používá fetální hovězí sérum o koncentraci 5 – 20 %.

## RŮSTOVÁ KŘIVKA

Růst neboli **proliferaci** buněk v kultuře charakterizuje růstová křivka složená ze 3 fází. Čerstvě nasazené buňky jsou nejprve kulaté, posléze začínají sedimentovat a adherovat k podložce. U buněčných linií buňky adherují již do 30 minut, u primokultur může tato fáze trvat déle. Jakmile se buňky přichytí k podložce, začínají se rozprostírat do tvaru charakteristického pro daný buněčný typ. Tato fáze je nazývána **lag fáze**. Po rozprostření vstupují buňky do logaritmické fáze růstu, tzv. **log fáze**, kdy buňky proliferují. Jakmile dosáhnou buňky konfluency, přechází kultura do tzv. **stacionární fáze** růstu, kdy se buňky přestávají dělit a spíše začínají postupně odumírat. Jednou z příčin zástavy dělení je kontaktní inhibice množení, která je typická pro většinu normálních netransformovaných buněk.



Obr. 3: Růstová křivka znázorňující jednotlivé fáze růstu buněčné kultury

## STANOVENÍ POČTU BUNĚK A ZJIŠTĚNÍ JEJICH VIABILITY

Aby bylo možné porovnávat, jak buňky reagují na určitý materiál nebo kultivační podmínky, bývá často nezbytné nasadit více pokusů se stejnou počáteční koncentrací buněk. Celý proces je tedy zahájen tím, že buňky, které rostou přisedlé na dně kultivační láhve, je nutné od povrchu oddělit. K tomu se nejčastěji používá roztok trypsinu s EDTA. Trypsin je enzym, který štěpí peptidické vazby proteinů za aminokyselinami L-argininem a L-lysinem. Jedná se tedy o relativně nespecifický enzym, který umožňuje rozštěpit proteiny séra, které pokrývají plastovou

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

kultivační nádobu a zprostředkovávají buněčnou adhezi. EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) patří mezi chelatační činidla, váže tedy dvojmocné ionty, v našem případě především  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou nezbytné pro správnou funkci cadherinů. To jsou transmembránové proteiny, které se podílejí na adhezi mezi buňkami. EDTA tedy napomáhá oddělit od sebe jednotlivé buňky a získat buněčnou suspenzi bez shluků.

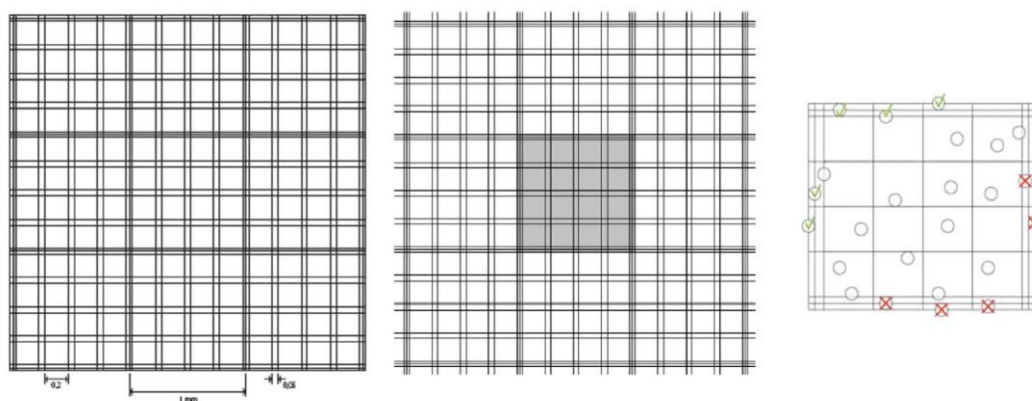
Pro určení koncentrace buněk v suspenzi se využívají počítací komůrky ve spojení se optickou mikroskopií, nebo se dnes již častěji využívá speciálních přístrojů pro automatizované počítání buněk. Jednou z nejčastěji využívaných počítacích komůrek je Bürkerova komůrka, která je tvořena silným sklem se dvěma vybroušenými poli, z nichž každé má vyznačenou počítací síť. Počítací síť je tvořena 9 velkými čtverci, každý o rozměru 1 x 1 mm, hloubka: 0,1 mm), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců, každý o ploše 0,04 mm<sup>2</sup>). Při počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky je nejprve nanesen malý objem testované suspenze mezi krycí a podložní sklo, komůrka se následně vloží do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se může přistoupit k samotnému počítání buněk. Aby se zabránilo dvojímu započítání téže buňky, počítávají se pouze ty buňky, které se nacházejí uvnitř čtverce a buňky, které se dotýkají dvou zvolených stran čtverce (např. horní a levá) Definovaný objem čtverce nám následně umožní přepočítat počet buněk v definovaném objemu jednoho čtverce na koncentraci buněk v 1 ml buněčné suspenze.

Při počítání buněk se často stanovuje také jejich viabilita, neboli životaschopnost. Jedná se o stanovení poměru živých a mrtvých buněk v populaci. Toto testování se může hodit nejen při nasazování buněk, kdy je třeba nasadit stejný počet živých buněk na vzorek, ale také se ho využívá ke stanovení cytotoxického účinku některých látek nebo, v případě tkáňového inženýrství, biomateriálů. Ke stanovení viability se často využívá roztoku trypanové modři, který se přidá k buněčné suspenzi v objemovém poměru 1:1. Toto barvivo neprochází intaktní buněčnou membránou, a tak živé buňky zůstávají neobarvené. U mrtvých buněk je však integrita buněčné membrány porušena a dochází k jejich modrému zbarvení.



Obr. 4: Bürkerova komůrka

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody



Obr. 5: Schéma mřížky Bürkerovy komůrky, šedě je vyznačen jeden z devíti velkých čtverců, obrázek vpravo znázorňuje správnou praxi započítávání buněk na rozhraní čtverce

### PŘÍSTROJE:

- Laminární box
- CO<sub>2</sub> inkubátor
- Invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem a fluorescencí
- Zařízení na přípravu ultračisté vody
- Centrifuga
- pH metr
- Analytické váhy

### POMŮCKY

- Kultivační desky/Petriho misky
- Pipety + špičky
- Falkonky
- Bürkerova komůrka
- Kultivační komory pro dynamickou kultivaci
- Podložní skla

### CHEMIKÁLIE

- PBS
- Trypsin-EDTA
- Trypanová modř

### POSTUP NAsAZENÍ BUNĚK DO KULTIVAČNÍ DESTIČKY:

1. Z kultivační láhve (25 cm<sup>2</sup>) odsát médium
2. Opláchnout buňky 5 ml sterilního PBS pufru
3. Odsát pufr
4. Přidat 0,5 ml roztoku Trypsin – EDTA a inkubovat 5 min v inkubátoru při 37°C
5. Provést kontrolu zakulacení buněk pod mikroskopem, pokud je to třeba, je možné poklepat na láhev ze strany rukou, aby se buňky uvolnily od podložky
6. Poté, co se buňky uvolnily do roztoku, přidat 5 ml kultivačního média se sérem (sérum obsahuje hodně proteinů, takže trypsin štípe také tyto proteiny a neničí tolik samotné buňky)
7. Buňky v médiu resuspendovat pipetou, aby je bylo možno všechny z láhve odstranit a přepipetovat do 15 ml falkonky
8. Stočit na centrifuze na 5 min, 300 g, 21 °C
9. Po stočení je na dně falkonky viditelná peleta obsahující buňky, odsát supernatant

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

10. Buňky resuspendovat v 1 ml čerstvého média se sérem (opakovaně nasát pipetou a vypustit, tj. řádně propipetovat)
11. Odebrat do mikrozkušavky 40  $\mu$ l dobře propipetované buněčné suspenze, přidat 40  $\mu$ l roztoku trypanové modři, propipetovat, po 10  $\mu$ l napipetovat do každého pole Bürkerovy komůrky
12. Spočítat živé a mrtvé buňky alespoň ve 3 velkých čtvercích každého pole Bürkerovy komůrky, počty zprůměrovat, stanovit viabilitu a vypočítat ředění buněčné suspenze
13. Buňky naředit na požadovanou hustotu (např. 15 000 buněk/cm<sup>2</sup>) a takto připravenou buněčnou suspenzi napipetovat do kultivační desky/kultivační komory/na podložní sklo.
14. Buňky vložit do inkubátoru a kultivovat za standardních kultivačních podmínek

## SYSTÉMY PRO MECHANICKOU ZÁTĚŽ BUNĚČNÉ KULTURY

Autor: Ing. Jana Štěpanovská, Ing. Roman Matějka

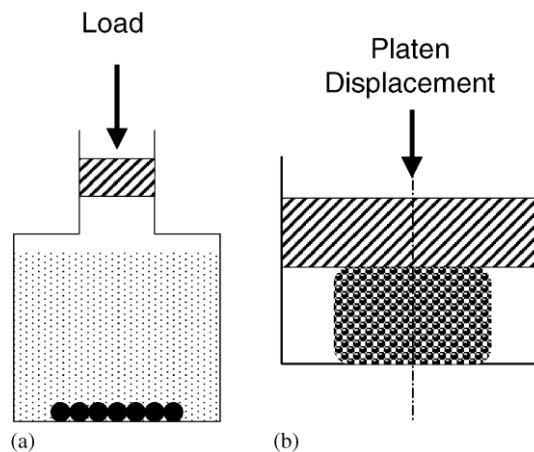
Mnoho systémů již byly navrženo pro mechanickou stimulaci buněčných a tkáňových kultur. Tyto přístroje mohou být rozděleny do kategorií v podmínkách pro jejich primární způsob namáhání: stlačení (hydrostatický tlak nebo přímý kontakt přítlačné desky), podélné roztahání, ohyb, osové symetrické vyduť substrátu, rozptyl rovinného substrátu a smykové napětí.

## KOMPRESIVNÍ NAMÁHACÍ SYSTÉMY

Hydrostatická komprese má několik podstatných výhod: jednoduchost zařízení, prostorová homogenita stimulu, snadnost konfigurace více zátěžových replikátů (pomocí rozdělovače) a snadnost dodání a přenosu buď statických nebo přechodných zátěžových vstupů. Vzhledem k nepřímému kontaktu s zatěžovacím systémem desky, nevzniká žádné nebezpečí ohledně lokálního stlačení vzorků a dochází tak k plynulému přenosu metabolitů mezi kultivační vrstvou a živným médiem. Dodávané zatížení navíc není závislé na stavu adheze mezi kulturou a jejím substrátem. Bohužel tlaky plynů v inkubátoru odpovídají kvazi-fyziologickému kultivačnímu stresu vedoucí k vysoké hladině pO<sub>2</sub> a pCO<sub>2</sub>. Další výkyvy mohou nastat při příliš nízké nebo vysoké frekvenci tlakových pulsů.



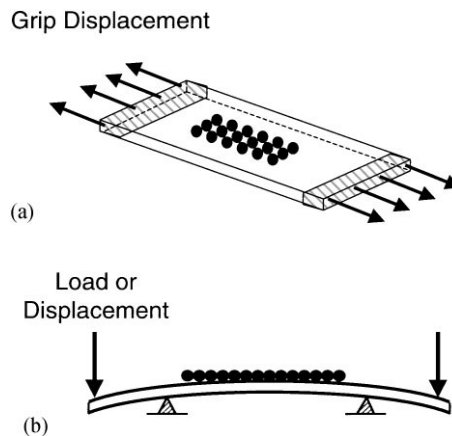
Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody



Obrázek 1 - sestavy pro kompresivní namáhání. A) kompresivní namáhání 2D buněčné kultury prostřednictvím tlaku šířícího se kultivačním médiem. B) tlakové namáhání buněk inkorporovaných do buněčného nosiče, který je přímo tlakově komprimován pístem.

## PODÉLNÉ JEDNOOSÉ NATAHOVÁNÍ SUBSTRÁTU

Systém pro podélné jednoosé namáhání jsou často využívána zejména kvůli jednoduché implementaci a nízké ceně. Podstatu je působení síly v jednom směru na substrát osazený buňkami, přičemž substrát musí být do jisté míry elastický. Z toho důvodu se nejčastěji používají silikonové, polystyrenové apod. polymerové substráty, příp. nativní tkáň.



Obrázek 2 - systémy s jednoosým namáháním a) podélnou tenzí, b) flexí substrátu.

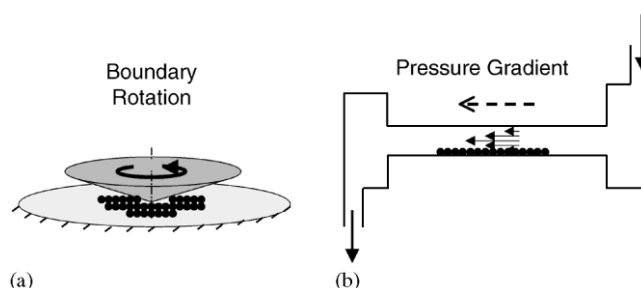
## PRŮTOKOVÉ SYSTÉMY SE SMYKOVÝM NAPĚTÍM

Proliferace širokého spektra buněk je závislá na působení smykového napětí, působícího na buněčné mechanoreceptory (mebránové receptory, iontové kanály, integriny apod.) mající vliv na další procesy (hladiny intracelulárního calcia, oxidu dusného, prostacyclin, remodelace cytoskeletu). Průtokové systémy využívají dvou konfigurací. Jednou je rotace kónického kužele

## Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

kolmo uloženého nad povrchem desky. Protože jak lokální relativní rychlost, tak i vzdálenost mezi povrchy kužele a desky se mění lineárně s radiální polohou, dosáhne toto uspořádání prostorově homogenního smykového napětí na obou příslušných površích. V závislosti na kuželovém zúžení a uložené úhlové rychlosti lze dosáhnout širokého rozsahu smykového napětí, které sahá i do turbulentního režimu.

Druhou hlavní konfigurací je sestava rovnoběžných desek, mezi kterými protéká médium. Vzhledem k malé velikosti štěrbiny vzniká mezi deskami laminární proudění a buňky jsou rovnoměrně namáhány smykovým napětím. Pohon média mezi deskami může být proveden jak gravitačně, tak může být poháněno i pumpou. V závislosti na geometrických vlastnostech desek a rychlosti proudění média může být vytvořeno variabilní smykové napětí.



Obrázek 3 - konfigurace systémů s průtokovým namáháním: a) rotující kužel, b) paralelní desky.

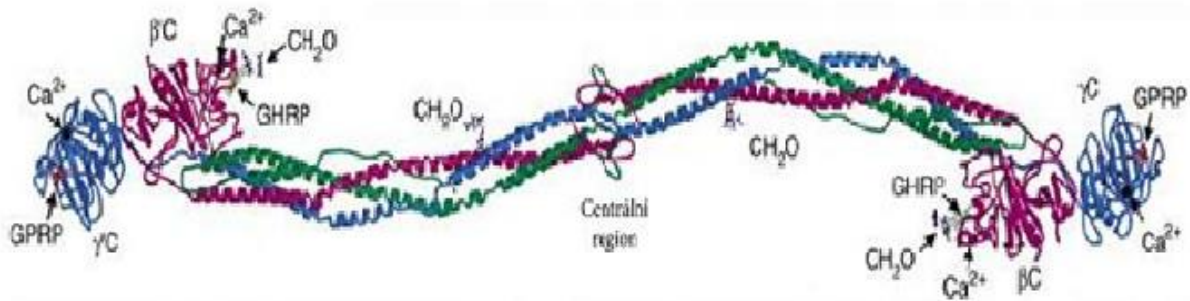
## PŘÍPRAVA GELOVÝCH SUBSTRÁTŮ JAKO NÁHRADA ECM

Extracelulární hmota (matrix, ECM) je substrát, ke kterému je uchycena většina buněk organismu. Buňka interaguje s ECM pomocí membránových glykoproteinů (integrinů), které přenášejí potřebné informace do nitra buňky. Následně pak dochází k expresi příslušných genů, a tím je ovlivněna proliferace, diferenciaci, maturace a pohyblivost buněk. ECM je složena z vláken kolagenu, elastinu, proteoglykanů, polysacharidu kys. hyaluronové a glykoproteinů odpovědných za interakci s buňkami (laminin, fibronectin).

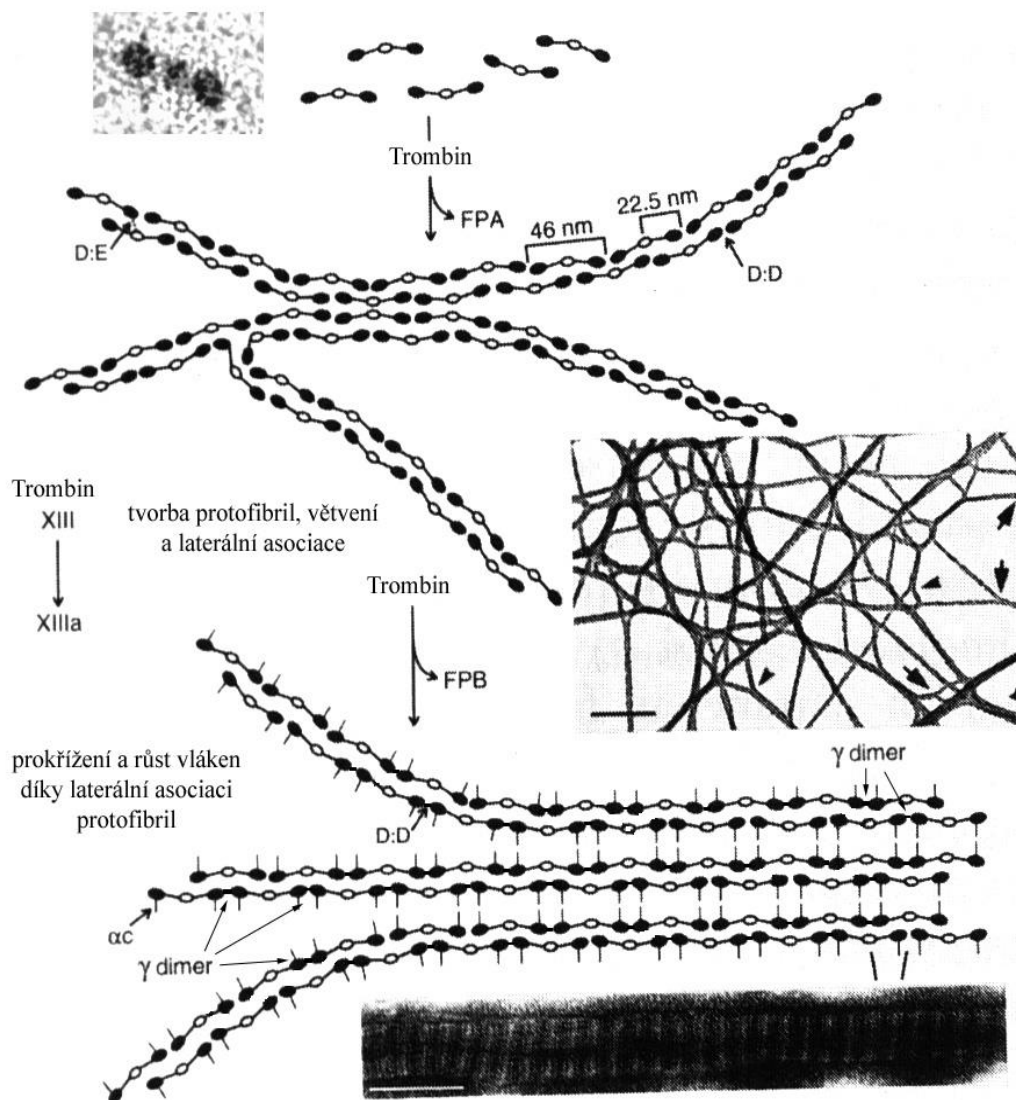
Ve všech tkáních dochází k pomalé obnově ECM. Zvýšená a regulovaná obnova ECM je patrná při hojení poranění. V okamžiku poranění dochází k porušení integrity cévního systému s následkem krvácení a extravazací složek krve do poraněného místa. Organismu se snaží s tímto stavem vyrovnat zachováním hemostázy díky aktivaci koagulační kaskády. Výsledným krokem koagulační kaskády je aktivace protrombinu na trombin, který přeměňuje fibrinogen na fibrin. Jednotlivé fibrinové monomery polymerují za vzniku fibrinové sítě. Tento fibrinový klot ucpává poraněné místo a chrání cévy před krvácením. Fibrinová síť rovněž podporuje migraci leukocytů, fibroblastů a endoteliálních buněk do poraněného místa a slouží jako dočasná matrice pro jejich ukotvení a proliferaci.

## VYUŽITÍ FIBRINOVÝCH SÍTÍ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Fibrinová síť napomáhá nejen k zástavě krvácení, ale zároveň poskytuje dočasnou matici, na kterou se vážou různé proteiny extracelulární matrix a růstové faktory. Společně tak výraznou měrou přispívají k obnově poraněné tkáně. Právě tyto rozmanité vlastnosti fibrinových sítí jsou hojně využívány v tkáňovém inženýrství a medicíně. Tzv. fibrinová lepidla se například používají k zástavě krvácení, dále jako náhrada sešití poraněných tkání, k léčbě tříselné kýly, k léčbě jater, chrupavek a kostí. Jedná se nejčastěji o roztoky fibrinogenu ve velmi vysokých koncentracích. Fibrinogen se po smíchání s trombinem rychle přeměňuje na fibrinový gel. Kombinace buněk přidaných do fibrinu slouží k doručení buněk na místo určení. Tento postup lze využít např. při hojení poranění kůže, nebo také při léčbě nekrotických míst na srdci po infarktu myokardu.



Obrázek 4 Molekula fibrinogenu (340 kDa). Fibrinogen se skládá ze 3 polypeptidových řetězců:  $\alpha$  řetězec – zelená,  $\beta$  řetězec – fialová,  $\gamma$  řetězec – modrá.



Obrázek 5 Tvorba fibrinové sítě.



Obrázek 6 Fibrinový gel.

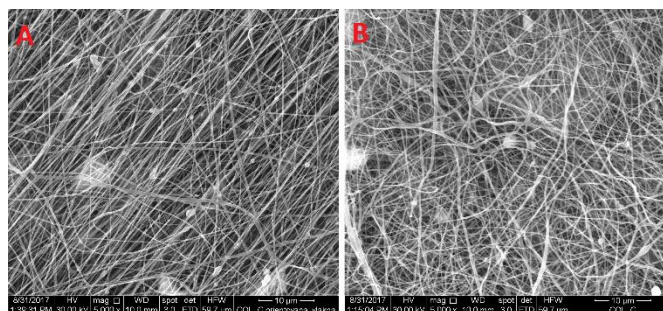
## VYUŽITÍ NANOVLÁKENÝCH NOSIČŮ JAKO SUBSTRÁTŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Nanovlákná připravená efektivní technologií elektrostatického zvlákňování (tj. elektrosponingu) zaznamenávají neustále rostoucí uplatnění ve všech sférách lidské činnosti, jako jsou průmyslové i biomedicínské technologie. Nanovláknenné materiály lze využít např. na odstranění mikrobiálních, organických i anorganických kontaminantů z vody a vzduchu na podkladě filtrace a adsorpce, pro hemodialyzační systémy, pro konstrukci senzorů včetně biosenzorů, pro cílenou dodávku a řízené uvolňování léčiv, pro buněčnou i genovou terapii, a zvláště pro konstrukci nosičů buněk (tzv. scaffoldů) pro tkáňové inženýrství. Nanovlákná totiž alespoň do jisté míry napodobují vláknitou složku přirozené extracelulární matrix, a jsou tudíž považována za vhodný substrát pro adhezi a růst buněk. Pro zvýšení buněčné adheze a růstu, a rovněž pro nasměrování jejich žádoucí diferenciaci a fenotypické maturace, lze tato nanovlákná funkcionalizovat různými chemickými funkčními skupinami a biologicky aktivními molekulami, jako jsou proteiny zprostředkující adhezi buněk (fibronectin, kolagen, laminin) a oligopeptidickými ligandy odvozenými z těchto proteinů (RGD, KRSR, IKVAV....), růstovými faktory (VEGF, FGF-2, BMP-4) či enzymy (např. alkalická fosfatáza pro navození mineralizace pro inženýrství kostní tkáně). Pomocí elektrostatického zvlákňování mohou být nanovlákná připravena z celé řady materiálů, jako jsou syntetické polymery (např. polylaktid, polyglykolid, polykaprolakton a jejich kopolymery), přírodní polymery (želatina, chitosan, silk

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

fibroin, deriváty celulózy), a dokonce i minerální substance, jako jsou fosfáty kalcia či oxidy křemíku pro inženýrství kostní tkáně. Pro inženýrství tvrdých tkání mohou být polymerní nanovlákná zpevněna i minerálními či uhlíkovými nanočásticemi (např. nanočásticemi hydroxyapatitu, grafenu, uhlíkových nanotrubiček, nanodiamantů), přidanými přímo do roztoku polymeru pro elektrospinning. Nanovláknenné matrice lze využít pro rekonstrukci širokého spektra tkání i orgánů – kromě již zmíněného inženýrství kostní tkáně jsou vhodné i pro kardiovaskulární tkáňové inženýrství, pro inženýrství tukové tkáně pro terapeutické i estetické rekonstrukce, pro rekonstrukci chrupavky, a v neposlední řadě i pro rekonstrukci kůže či jako léčivé a antimikrobiální kryty pro hojení akutních i chronických ran včetně popálenin, proleženin, diabetických defektů.

V případě elektrostatického zvláknování je ovlivněna výsledná struktura vláken řadou parametrů. Kromě volby samotného polymeru a rozpouštědla ovlivňuje výsledné vlákno gradient elektrického pole – tj. samotná velikost napětí a vzdálenost emitoru a kolektoru; forma emitoru (jehlový nebo bezjehlový emitor) a kolektor (statický; rotační; strukturovaný).



Obrázek 7 – srovnání orientovaných A a neorientovaných B nanovláken kolagenu 1. Orientace nanovláken bylo dosaženo pomocí zachytávání vláken na rotační elektrodu.

## PŘÍPRAVA NANO VLÁKENNÉHO NOSIČE Z KOLAGENU TYPU 1

### VYBAVENÍ A POMŮCKY

- Systém na přípravu nanovláken
- Laminární box
- Systém na přípravu ultračisté vody
- Analytické váhy

Příprava musí probíhat ve sterilních podmínkách!

## PŘÍPRAVA POLYMERU

1. Navažte a odměřte látky potřebné pro přípravu polymeru pro zvláknění – pracujte v digestoři, a používejte skleněné nádoby
  - a. Kolagen typ 1 – celkový podíl bude 8% hmotnostně
  - b. Rozpouštědlo roztok kys. Octové
2. Připravený roztok dejte rozvolnit do třepačky

## PŘÍPRAVA NEORIENTOVANÉHO NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE POMOCÍ JEHLY

1. Připravený roztok nasajte do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vláknění – základní nastavení
  - a. Připravte emitor s jednou jehlou vel. G20
  - b. Připravte kolektor typu plošná deska a umístěte na jeho povrch vrstvu sterilní netkanné textile
  - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
  - a. Depoziční vzdálenost 25 cm
  - b. Nastavte základní napětí 40 kV
  - c. Dávkovaný objem nastavte na 50 ul/min
  - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 20 l/min
4. Spusťte vlákníci proces
  - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vlákníci trysky, cca. 45 – 50 kV dle stupně rozvolnění
  - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 60 – 75 ul
5. Deponujte po dobu 20 minut

Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna nařežte na čtverce 25 x 25 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením.
7. Sterilní vlákna uchyťte do kultivační komory.

### PŘÍPRAVA ORIENTOVANÉHO NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE POMOCÍ BEZJEHLOVÉHO EMITORU

1. Doplňte polymer do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vlákennění – základní nastavení
  - a. Připravte dvoukanálový emitor pro bezjehlové zvláknění
  - b. Připravte kolektor plný válec a jeho povrch důkladně očistěte etanolem
  - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
  - a. Depoziční vzdálenost 20 cm
  - b. Nastavte základní napětí 45 kV
  - c. Dávkovaný objem nastavte na 100 ul/min
  - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 20 l/min
  - e. Otáčky válce nastavte na 3300 1/min
4. Spusťte vlákníci proces
  - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vlákníci trysky, cca. 50 – 60 kV dle stupně rozvolnění
  - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 120-140 ul
5. Deponujte po dobu 20 minut
6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna odřízněte podélně a poté rozdělte na čtverce 25 x 25 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením.
7. Sterilní vlákna uchyťte do kultivační komory.

### PŘÍPRAVA FIBRINOVÉHO HYDROGELU PRO ODLITÍ NA NANOVLÁKENNÝ SUBSTRÁT

#### VYBAVENÍ A POMŮCKY

- Horkovzdušný sterilizátor
- Laminární box
- Systém na přípravu ultračisté vody
- Analytické váhy
- Invertovaný fluorescenční mikroskop





Návod na cvičení 1: Tkáňové kultury – základní metody

Příprava musí probíhat ve sterilních podmínkách!

- 1) Zásobní fibrinogen
- 2) Zásobní trombin
- 3) Tris pufr pH 7,4
- 4) Buněčná suspenze

## POSTUP

- 1) Připravenou suspenzi buněk rozřeďte ve 400  $\mu$ l média
- 2) K suspenzi přidejte fibrinogen, aby výsledná koncentrace fibrinogenu byla 1 mg/ml
- 3) Roztok fibrinogenu a buněk naneste do kultivační komory
- 4) Připravte si roztok trombinu o koncentraci 2 U/ml, ředíte Tris pufrém pH 7,4
- 5) Roztok trombinu přidejte k roztoku v kultivační komoře rovnoměrně po celém povrchu. POZOR! Pracujte při nanášení co nejrychleji, gel se bude tvořit v komoře rychle.
- 6) Ponecháte tvořit klot cca 5 minut a následně dovestavte kultivační komoru a vložíte ji do inkubátoru.
- 7) Připojte komoru k systému pro mechanické zatěžování buněčné kultury. Zaznamenávejte každou hodinu stejné zorné pole fázovým mikroskopem a vyhodnoťte vliv mechanické zátěže na proliferaci buněk v gelu.

## KONTROLNÍ OTÁZKY

- 1) Co je extracelulární matrix?
- 2) Co je výsledkem koagulační kaskády?
- 3) Co jsou biomateriály?
- 4) Co jsou nanovlákná a jak jsou charakterizovaná?
- 5) Jaký je rozdíl mezi technikou jehlové a bezjehlové konfigurace u elektrosvláknění?
- 6) Jak je možné docílit orientace nanovláken?
- 7) Jak vzniká fibrinový gel?
- 8) K čemu používá fibrinový gel v medicíně?
8. Jaký je rozdíl mezi primokulturou a buněčnou linií?
9. Co vyjadřuje Hayflickův limit?
10. V jaké růstové fázi jsou nejpatrnější rozdíly v růstu buněk na jednotlivých vzorcích?
11. Jaký je objem v mikrolitrech velkého čtverce Bürkerovy komůrky?
12. Průměrně jsme ve velkých čtvercích Bürkerovy komůrky napočítali 45 buněk a z nich byly 3 buňky modře zbarvené. Vypočítejte koncentraci buněčné suspenze a stanovte viabilitu buněčné kultury.



## DOPORUČENÁ LITERATURA

Magdalena Jedrzejczak-Silicka (2017). History of Cell Culture, New Insights into Cell Culture Technology, Dr. Sivakumar Joghi Thatha Gowder (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/66905.

Skloot, Rebecca. *The Immortal Life Of Henrietta Lacks*. New York : Crown Publishers, 2010.

Wikimedia Foundation. (2023, October 26). Henrietta lacks. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Henrietta\\_Lacks](https://en.wikipedia.org/wiki/Henrietta_Lacks), Straube, T., Müller, C., & Perestrelo, A. R. (2023, February 6). How to do a proper cell culture quick check. Science Lab | Leica Microsystems. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>

vlastní archiv autora

